

STUDI KERAGAMAN GENETIK *Tarsius* sp. ASAL KALIMANTAN, SUMATERA, DAN SULAWESI BERDASARKAN SEKUEN GEN *NADH DEHYDROGENASE* SUB-UNIT 4L (ND4L)

Genetic Diversity Study on Tarsius sp. Origin from Kalimantan, Sumatera, and Sulawesi Based On NADH Dehydrogenase Sub-Unit 4L (ND4L) Gene Sequences

Rini Widayanti¹ dan Trini Susmiati¹

¹Bagian Biokimia Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
E-mail: riniwida@yahoo.co.uk

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah mengaji keragaman genetik gen ND4L masing-masing spesies *Tarsius* yang dapat digunakan sebagai penanda genetik. Hasil *polymerase chain reaction* (PCR) gen ND4L menggunakan primer ND4LF dan ND4LR diperoleh 478 bp, setelah dilakukan sekuensing didapatkan sekuen gen ND4L sebesar 297 nt. Sekuen gen ND4L disejajarkan berganda dengan primata lain dari *Genbank* menggunakan Clustal W, dan kemudian keragaman genetik antar spesies dianalisis menggunakan program MEGA versi 5.0 (Nei dan Kumar, 2002). Di antara sampel *Tarsius* ditemukan satu situs nukleotida beragam, yaitu pada situs ke 162. Jarak genetik berdasarkan basa nukleotida ND4L dihitung menggunakan model dua parameter-Kimura menunjukkan paling kecil sebesar 0%, paling besar 0,3%, dan rata-rata 0,1 %. Pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor joining* tidak dapat membedakan antara *Tarsius* dari Sumatera, Kalimantan, dan Sulawesi, dan mengelompokkan *Tarsius* dalam subordo *Strepsirrhini*.

Kata kunci: *Tarsius* sp., gen ND4L, sekuensing, keragaman, nukleotida

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the genetic diversity of ND4L gene, and the expected presence of diversity in these genes can be used as genetic markers each species of *Tarsius*. Polymerase chain reaction (PCR) of ND4L gene using primer ND4LF and ND4LR obtained 478 bp, after sequencing the ND4L gene sequences obtained for 297 nt. The ND4L sequences gene was then multiple aligned with other primates from *Genbank* using Clustal W, and then the genetic diversity among species were analyzed using MEGA version 5.0 (Nei and Kumar, 2002). A different nucleotide site was found among *Tarsius* samples, at the 162 site. Genetic distances based on ND4L nucleotide base which calculated by using Kimura two-parameter model showed the lowest at 0%, highest at 0.3% and the average at 0.1%. Phylogenetic tree using the Neighbor joining method can not distinguish between the *Tarsius* from Sumatera, Kalimantan and Sulawesi, and grouping *Tarsius* in the suborder *Strepsirrhini*.

Key words: *Tarsius* sp., ND4L genes, sequencing, diversity, nucleotide

PENDAHULUAN

Indonesia merupakan negara yang memiliki kekayaan keanekaragaman hayati. Namun saat ini kondisi hayati Indonesia mulai memprihatinkan oleh karena populasinya yang semakin menurun akibat semakin sempitnya habitat yang ditempatinya, dan karena pemanenan hayati yang tidak diimbangi dengan usaha pelestariannya. Salah satu contoh kekayaan hayati yang semakin punah keberadaannya adalah *Tarsius* sp. Upaya pelestarian sudah dilakukan melalui diterbitkannya Peraturan Perburuan Binatang Liar (PPBL) no 226/1931, UU no 5/1990, UU no 7/199, dimasukkannya ke daftar IUCN dalam kategori *endangered species*, dalam CITES, digolongkan dalam Apendix II, serta dilakukan konservasi *in-situ* maupun *ex-situ*. Namun upaya konservasi satwa tersebut mengalami kendala karena secara morfologi spesies *Tarsius* sulit dibedakan.

Tarsius merupakan primata terkecil di dunia, termasuk satwa nokturnal, memiliki berat badan ± 150 gram, bola mata besar, dan kepala dapat diputar hingga 180°. Sistematika berdasar morfologi yang didukung vokalisasi, menyatakan bahwa genus *Tarsius* dibagi menjadi 5 spesies yaitu *Tarsius bancanus* (Sumatera dan Kalimantan), *T. spectrum*, *T. diana*, *T. pumilus*, *T. sangiriensis*, *T. pelengensis* (Sulawesi), dan *T. syrichta*

(Filipina) (Musser dan Dagosto, 1987; Groves, 2001), *T. larian* (Merker dan Groves, 2006), *T. tumpara* (Shekelle *et al.*, 2008), dan *T. wallacei* (Merker *et al.*, 2010).

Gen *NADH dehydrogenase* sub-unit 4L (ND4L) adalah merupakan salah satu gen penyandi *NADH dehydrogenase* sub-unit 4L, yaitu suatu enzim yang berperan pada proses respirasi sel di dalam mitokondria. Menurut Zhang *et al.* (2000) sekuen gen ND4L oleh karena memiliki keragaman di dalam nukleotidanya dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk *Acipenseriformes* (Pastorini *et al.*, 2001) dan penanda genetik *Microcebus* sp. (Hofman *et al.*, 2012). Tujuan dari penelitian ini adalah mengaji keragaman genetik gen ND4L masing-masing spesies *Tarsius* dan diharapkan dapat digunakan sebagai penanda genetik serta meneguhkan taksonomi *Tarsius* di dalam kelompok primata.

MATERI DAN METODE

Sampel *Tarsius* yang digunakan adalah lima ekor *Tarsius bancanus* asal Sumatera, tiga ekor *T. bancanus* asal Kalimantan Barat, tiga ekor *T. spectrum* asal Sulawesi Utara, dan satu ekor *T. diana* asal Sulawesi Tengah. Primer untuk mengamplifikasi gen ND4L didesain menggunakan program *primer3 online*.

Tabel 1. Susunan primer ND4LF dan ND4LR, *melting temperatur*, dan besarnya produk PCR

Target	Primer	Urutan Basa	Jumlah Basa	T _m
478 bp	ND4LF	5' AACTAATCTCTATTCTAGC 3'	20	54,37° C
	ND4LR	5' GTGTCATGTTAGTGGAATTA 3'	20	54,37° C

Susunan primer, *melting temperature*, dan besarnya produk *polymerase chain reaction* (PCR) disajikan pada Tabel 1.

Isolasi DNA Total

Deoxynucleicacid (DNA) total diekstraksi dari darah dan jaringan. Darah diambil dari pembuluh darah pada pangkal ekor, ditambah larutan EDTA 10% sebagai antikoagulan. Potongan telinga diambil dari *Tarsius* disimpan dalam media *RNA lather* (Qiagen) untuk menjaga kerusakan DNA dari nuklease. Isolasi dan purifikasi DNA menggunakan DNA *Isolation Kit* (Qiagen).

Amplifikasi Gen ND4L dengan PCR

Deoxynucleicacid (DNA) total hasil ekstraksi digunakan sebagai DNA cetakan untuk proses amplifikasi. Komposisi 25 µl campuran pereaksi PCR terdiri atas *Kapa Taq DNA polymerase, ready mix* (1st BASE) sebanyak 12,5 µl, 100-300 ng DNA cetakan, 10 pmol masing-masing primer dan ditambahkan *nuclease free water* (Microzone) hingga mencapai volume 25 µl.

Amplifikasi DNA dengan PCR pada penelitian ini menggunakan mesin *Invinigen* (Biotech, Inc.). Amplifikasi gen ND4L dilakukan dengan kondisi: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 30 detik untuk denaturasi, 49° C selama 45 detik untuk penempelan primer (*annealing*), 72° C selama 45 detik untuk pemanjangan (*elongation*); amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus kemudian *post elongation* 5 menit pada 72° C.

Deoxynucleicacid total hasil isolasi dan Produk PCR dideteksi dengan cara dimigrasikan pada gel agarosa 1,2% yang telah ditambah dengan *good view* (Microzone), menggunakan bufer 1xTBE dalam piranti *Submarine Electrophoresis* (Hofer, USA). Pengamatan dilakukan dengan UV transluminator ($\lambda = 300$ nm). Penanda DNA dengan ukuran 100 pb (1st BASE)

digunakan sebagai penunjuk berat molekul.

Sekuensing Gen ND4L

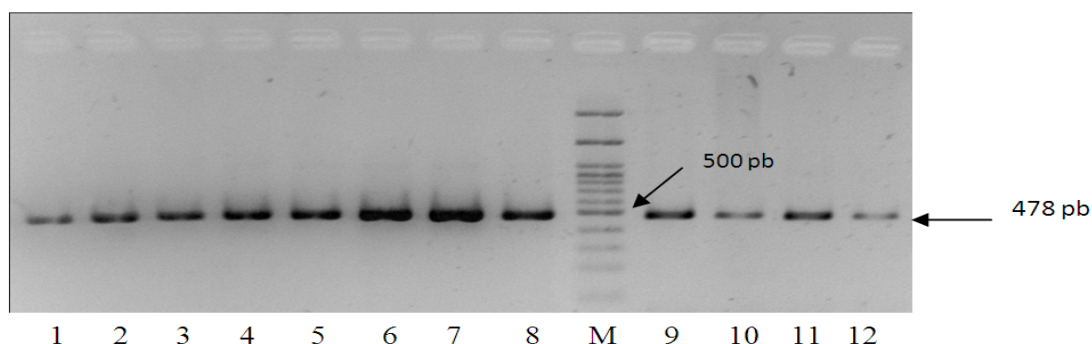
Produk PCR hasil amplifikasi dipurifikasi, selanjutnya digunakan sebagai DNA cetakan untuk reaksi sekuensing DNA. Kondisi untuk reaksi sekuensing adalah sebagai berikut: denaturasi awal selama 5 menit pada suhu 94° C selanjutnya diikuti dengan 94° C selama 30 detik, 49° C selama 45 detik, 72° C selama 45 detik; reaksi amplifikasi sebanyak 35 siklus kemudian diakhiri dengan penambahan (*extension*) selama 5 menit pada 72° C. Sekuensing DNA menggunakan alat sekuensing DNA otomatis *ABI Prism*. Sekuensing DNA dilakukan dua kali reaksi menggunakan primer *forward* dan *reverse* untuk semua sampel *Tarsius*.

Analisis Data

Data sekuens gen ND4L dan sekuens DNA yang diperoleh dari *data bases* internasional pada *multiple alignment* dengan program *Clustal W* (Thompson *et al.*, 1994). Selain berdasarkan sekuens nukleotida, gen ND4L dianalisis berdasarkan urutan asam amino dari basa-basa yang diterjemahkan mengikuti *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada dalam MEGA versi 5 (Nei dan Kumar, 2002). Jarak genetik dianalisis menggunakan metoda Kimura dua parameter dan pohon filogenetik menggunakan metode *Neighbor Joining* dengan nilai *bootstrap* 1000 kali ulangan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Deoxynucleicacid (DNA) total setelah diisolasi kemudian digunakan sebagai cetakan untuk amplifikasi gen ND4L dengan PCR. Amplifikasi gen ND4L menggunakan primer ND4LF dan ND4LR menghasilkan produk PCR sepanjang 478 pasang basa (bp). Produk PCR gen ND4L disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Hasil PCR gen ND4L menggunakan primer ND4LF dan ND4LR sampel *Tarsius* sp. pada gel agarosa 1,2% (1-5: *T.bancanus* 2,3,4,7,10 (Lampung); 6-8: *T.bancanus* 1,2,3 (Kalimantan); M: DNA Ladder 100 pb; 9-11: *T.spectrum* 2,3,5; 12: *T.dianae*)

```

5' ... cccctatgaatgcgggttttgacctacagaatacagcccgcctcccccttctctataaaattt
9658 ttccctaatacgccattacctttctcttatttcgatctagagatcgcccttcttctcccccto
9718 ccctgagccaccaacaatacaaatcttagtctcataatatatttatagccctaaacactaatc
                                     >>>>>>>
9778 tctattctagcccttaggcctcgcatcacgaatggactcaaaaaggacttgaatgaaccgaa
>>>>>>>>>
9838 tataattagtttaactaaaaacaaatgatttcgactcattaattatgaacagtacataa
9898 ttaccaaaatgccatatatttacactaacctcttctctcgcttctctcacatccctcctag
9958 gcatactaatttatcgctcacatctcatatcttcactactatgtctagaagggtataatac
10018 tctcaatattcattataacctcactaacaatcctaaaccttcacttcacttttatcttaata
10078 taattccaatcatttctcctagtattcgcagcctgcgaagcagctgtaggattagccctgc
10138 tagtaatagtatcaaacacatatggcctagactatgtacaaaacctaaaccttctccaat
10198 gctaaaaatcatcctaccaacatttatgttaattccactaacatgacactccaaaaaaaaa
                                <<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
10258 caatatctgaattaatactacagcccagacagtctaataattagccttattaccctttccct
10318 cctaaaccactgatacaacaccaatataaaatttttcactttaccttttttactgactccct
10378 atcaacacccctactcatttttaaccacctgactactcccttaatagttatagccagtca 3' ...

```

Gambar 2. Letak penempelan primer ND4LF dan ND4LR (Keterangan: >>>>>: letak penempelan primer ND4LF (*forward*) pada gen ND3; <<<<<: letak penempelan primer ND4LR (reverse) pada gen *ND4*; gen tRNA^{Arg}; *spacer*; gen ND4L; daerah *overlapping*).

Menurut Schmitz *et al.* (2002), pada *T. bancanus* gen ND4L memiliki jumlah nukleotida 297 bp, berada diantara gen tRNA^{Arg} di sebelah *upstream* (5') dan gen ND4 disebelah *downstream* (3'). Berdasarkan sekuen genom mt-DNA *T. bancanus* tersebut fragmen DNA hasil amplifikasi pada penelitian ini terletak pada gen ND3 (basa ke-69 dari ujung 3' gen ND3) sampai pada basa ke-44 dalam gen ND4 dari ujung 5'. Skema letak penempelan primer untuk mengamplifikasi gen ND4L disajikan pada Gambar 2.

Besarnya fragmen DNA yang teramplifikasi pada penelitian ini setelah diplotkan dengan data sekuens DNA mitokondria *T. bancanus* hasil penelitian Schmitz *et al.* (2002) adalah 478 pb, terdiri atas 69 bp fragmen gen ND3; 67 bp gen tRNA^{Arg}; 1 bp *spacer*; 297 bp gen ND4L (11 bp *overlapping* dengan gen ND4); dan 44 bp fragmen gen ND4 (11 bp *overlapping* dengan gen ND4L).

Hasil sekuensing gen ND4L dari semua sampel *Tarsius* disejajarkan berganda (*multiple alignment*) dengan primata spesies lain yang diambil dari *Genbank*. Hasil sekuensing yang merupakan sekuen gen ND4L (297 nt) kemudian dianalisis keragaman nukleotida dan asam aminonya dengan pembandingan *T. bancanus* (NC_002811) dan *T. syrichta* (NC_012774) yang diambil dari data *Genbank*. Hasil analisis menunjukkan bahwa keragaman nukleotida di antara sampel *Tarsius* sangat kecil, hanya ada 1 situs nukleotida yang berbeda yaitu pada situs ke 162. Pada *T. bancanus* 4 dan 7 asal Lampung adalah basa Sitosin, sedangkan pada sampel *Tarsius* yang lain adalah Timin. Pada sampel *T.bancanus* 2,3, dan 10 asal Lampung juga sama dengan sampel *Tarsius* lainnya. Hal ini menunjukkan bahwa perubahan atau mutasi pada situs tersebut tidak dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk *T.bancanus* asal Lampung karena di dalam kelompok tersebut juga ada yg memiliki basa yang sama dengan *Tarsius* asal Kalimantan dan Sulawesi.

Hasil peninjauan berganda sekuen gen ND4L Tarsius penelitian dengan *T.bancanus* dan *T.syrichta* yang diambil dari *Genbank* disajikan pada Gambar 3. Nukleotida hasil sekuensing setelah ditranslasikan ke dalam asam amino yang diterjemahkan berdasarkan *vertebrate mitochondrial translation code* yang ada dalam MEGA versi 5 menunjukkan bahwa perbedaan nukleotida pada situs ke-169 tersebut merupakan *silent mutation*, yaitu tidak terjadi perubahan pada susunan asam aminonya.

Dua ratus sembilan puluh tujuh nukleotida penyusun gen ND4L setelah diterjemahkan menjadi asam amino, didapatkan total 99 asam amino. Tidak adanya perbedaan komposisi asam amino pada semua sampel Tarsius, menunjukkan bahwa Tarsius asal Lampung (Sumatera), Kalimantan, dan Sulawesi (Sulawesi Utara dan Sulawesi Tenggara) sangat dekat kekerabatannya. Oleh karena pada tingkat nukleotida hanya ada 1 situs yang berbeda dan tidak adanya perbedaan asam aminonya berarti bahwa sekuen nukleotida dan asam amino ND4L tidak dapat dijadikan sebagai penanda genetik Tarsius dari keempat daerah tersebut.

Hasil analisis dari semua *Tarsius* dalam penelitian yang menggunakan metode Kimura dua parameter menunjukkan bahwa jarak genetik paling besar adalah 0,3%, paling kecil 0% dan rata-rata 0,1%. Data tersebut menunjukkan bahwa kekerabatan dari semua sampel *Tarsius* pada penelitian ini adalah sangat dekat. Jarak genetik *Tarsius* penelitian, *T. bancanus* (*Genbank*) dan *T. syrichta* (*Genbank*) disajikan pada Tabel 2. Hal ini sangat berbeda dengan penelitian yang telah dilakukan oleh Zhang *et al.* (2000) yang dapat digunakan sebagai penanda genetik untuk *Acipenseriformes*, Pastorini *et al.* (2001) digunakan untuk penanda genetik *Microcebus* sp., dan Hofman *et al.* (2012), dapat digunakan sebagai penanda genetik *Pelophylax*.

#T.bancanus (GB)	ATG CCA TAT ATT TAC ACT AAC CTC TTC CTC GCT TTC CTC ACA TCC	[45]
#T.bancanus4 (Lampung) T. C.	[45]
#T.bancanus7 (Lampung) T. C.	[45]
#T.bancanus3 (Lampung) T. C.	[45]
#T.bancanus2 (Lampung) T. C.	[45]
#T.bancanus10 (Lampung) T. C.	[45]
#T.bancanus1 (Kalimantan) T. C.	[45]
#T.bancanus2 (Kalimantan) T. C.	[45]
#T.bancanus3 (Kalimantan) T. C.	[45]
#T.dianae (SULTENG) T. C.	[45]
#T.spectrum5 (SULUT) T. C.	[45]
#T.spectrum2 (SULUT) T. C.	[45]
#T.spectrum3 (SULUT) T. C.	[45]
#T.syrichta (GB)G ..C ..CT.T G..T ..T ..C ..T ..AA	[45]
#T.bancanus (GB)	CTC CTA GGC ATA CTA ATT TAT CGC TCA CAT CTC ATA TCT TCA CTA	[90]
#T.bancanus4 (Lampung)	[90]
#T.bancanus7 (Lampung)	[90]
#T.bancanus3 (Lampung)	[90]
#T.bancanus2 (Lampung)	[90]
#T.bancanus10 (Lampung)	[90]
#T.bancanus1 (Kalimantan)	[90]
#T.bancanus2 (Kalimantan)	[90]
#T.bancanus3 (Kalimantan)	[90]
#T.dianae (SULTENG)	[90]
#T.spectrum5 (SULUT)	[90]
#T.spectrum2 (SULUT)	[90]
#T.spectrum3 (SULUT)	[90]
#T.syrichta (GB)G ..T ... T.. ..ACC ..G	[90]
#T.bancanus (GB)	CTA TGT CTA GAA GGT ATA ATA CTC TCA ATA TTC ATT ATA ACC TCA	[135]
#T.bancanus4 (Lampung)A	[135]
#T.bancanus7 (Lampung)A	[135]
#T.bancanus3 (Lampung)A	[135]
#T.bancanus2 (Lampung)A	[135]
#T.bancanus10 (Lampung)A	[135]
#T.bancanus1 (Kalimantan)A	[135]
#T.bancanus2 (Kalimantan)A	[135]
#T.bancanus3 (Kalimantan)A	[135]
#T.dianae (SULTENG)A	[135]
#T.spectrum5 (SULUT)A	[135]
#T.spectrum2 (SULUT)A	[135]
#T.spectrum3 (SULUT)A	[135]
#T.syrichta (GB)CCTT	[135]
#T.bancanus (GB)	CTA ACA ATC CTA AAC CTT CAC TTC ACT TTA TCT AAT ATA ATT CCA	[180]
#T.bancanus4 (Lampung)GCCCC	[180]
#T.bancanus7 (Lampung)GCCCC	[180]
#T.bancanus3 (Lampung)GCCCC	[180]
#T.bancanus2 (Lampung)GCCCC	[180]
#T.bancanus10 (Lampung)GCCCC	[180]
#T.bancanus1 (Kalimantan)GCCCC	[180]
#T.bancanus2 (Kalimantan)GCCCC	[180]
#T.bancanus3 (Kalimantan)GCCCC	[180]
#T.dianae (SULTENG)GCCCC	[180]
#T.spectrum5 (SULUT)GCCCC	[180]
#T.spectrum2 (SULUT)GCCCC	[180]
#T.spectrum3 (SULUT)GCCCC	[180]
#T.syrichta (GB)	T..TTC.. G.. ..CC	[180]
#T.bancanus (GB)	ATC ATT CTC CTA GTA TTC GCA GCC TGC GAA GCA GCT GTA GGA TTA	[225]
#T.bancanus4 (Lampung)	..T ..C	[225]
#T.bancanus7 (Lampung)	..T ..C	[225]
#T.bancanus3 (Lampung)	..T ..C	[225]
#T.bancanus2 (Lampung)	..T ..C	[225]
#T.bancanus10 (Lampung)	..T ..C	[225]
#T.bancanus1 (Kalimantan)	..T ..C	[225]
#T.bancanus2 (Kalimantan)	..T ..C	[225]
#T.bancanus3 (Kalimantan)	..T ..C	[225]
#T.dianae (SULTENG)	..T ..C	[225]
#T.spectrum5 (SULUT)	..T ..C	[225]
#T.spectrum2 (SULUT)	..T ..C	[225]
#T.spectrum3 (SULUT)	..T ..C	[225]
#T.syrichta (GB)	..T ..ACTCT ..	[225]

#T.bancanus (GB)	GCC	CTG	CTA	GTA	ATA	GTA	TCA	AAC	ACA	TAT	GGC	CTA	GAC	TAT	GTA	[270]
#T.bancanus4 (Lampung)	...	A	[270]
#T.bancanus7 (Lampung)	...	A	[270]
#T.bancanus3 (Lampung)	...	A	[270]
#T.bancanus2 (Lampung)	...	A	[270]
#T.bancanus10 (Lampung)	...	A	[270]
#T.bancanus1 (Kalimantan)	...	A	[270]
#T.bancanus2 (Kalimantan)	...	A	[270]
#T.bancanus3 (Kalimantan)	...	A	[270]
#T.dianae (SULTENG)	...	A	[270]
#T.spectrum5 (SULUT)	...	A	[270]
#T.spectrum2 (SULUT)	...	A	[270]
#T.spectrum3 (SULUT)	...	A	[270]
#T.syrichtha (GB)	...	AG	..GTC	..TT	[270]
#T.bancanus (GB)	CAA	AAC	CTA	AAC	CTT	CTC	CAA	TGC	TAA							[297]
#T.bancanus4 (Lampung)							[297]
#T.bancanus7 (Lampung)							[297]
#T.bancanus3 (Lampung)							[297]
#T.bancanus2 (Lampung)							[297]
#T.bancanus10 (Lampung)							[297]
#T.bancanus1 (Kalimantan)							[297]
#T.bancanus2 (Kalimantan)							[297]
#T.bancanus3 (Kalimantan)							[297]
#T.dianae (SULTENG)							[297]
#T.spectrum5 (SULUT)							[297]
#T.spectrum2 (SULUT)							[297]
#T.spectrum3 (SULUT)							[297]
#T.syrichtha (GB)	T..	..G.	...	T.A							[297]

Gambar 3. Hasil penjajaran berganda sekuen gen ND4L (297 nt) Tarsius penelitian dengan *T.bancanus* dan *T.syrichtha* yang diambil dari *Genbank* (Keterangan: (.) : identik dengan basa di atasnya. ■ : situs beragam antara *T. syrichtha* (GB), *T.bancanus* (GB), dan diantara sampel Tarsius penelitian; ■ : situs beragam antara *T. syrichtha* (GB), *T.bancanus* (GB) dan *Tarsius* penelitian).

Menurut Zardoya and Meyer (1996), banyak faktor untuk mendapatkan filogenetik yang benar dengan menggunakan DNA mitokondria, salah satunya adalah waktu pemisahan dari spesies-spesies tersebut, kecepatan regenerasi (frekuensi pembentukan garis keturunan) dan keragaman dari sekuen nukleotida yang digunakan sebagai penanda genetik. Pada penelitian ini, kemungkinan sekuen gen ND4L termasuk gen yang tingkat mutasinya rendah, bahkan lebih rendah dari penelitian Widayanti dan Handayani (2011, *in press*) pada *Tarsius* sp. dengan menggunakan gen ATP6 (0,2%), pada gen ND3 (0,1%) (Widayanti *et al.*, 2011),

pada daerah *D-loop* (2,3%) (Widayanti dan Solihin 2007), dan jarak genetik pada gen *COX2* (4,03%) (Widayanti *et al.*, 2010). Penelitian pada *Tarsius* menggunakan gen *Cyt b* (Widayanti *et al.*, 2006), dan gen ATP8 (Widayanti, 2010) saja yang memiliki keragaman tinggi, yaitu berturut-turut 13,1 dan 13,4%, walaupun pada tingkat asam amino gen *Cyt b* dan gen ATP8 tersebut kurang memberikan hasil yang memuaskan. Oleh karena itu masih perlu dilakukan penelitian pada gen-gen lain yang kemungkinan dapat digunakan sebagai penanda genetik spesies-spesies *Tarsius*.

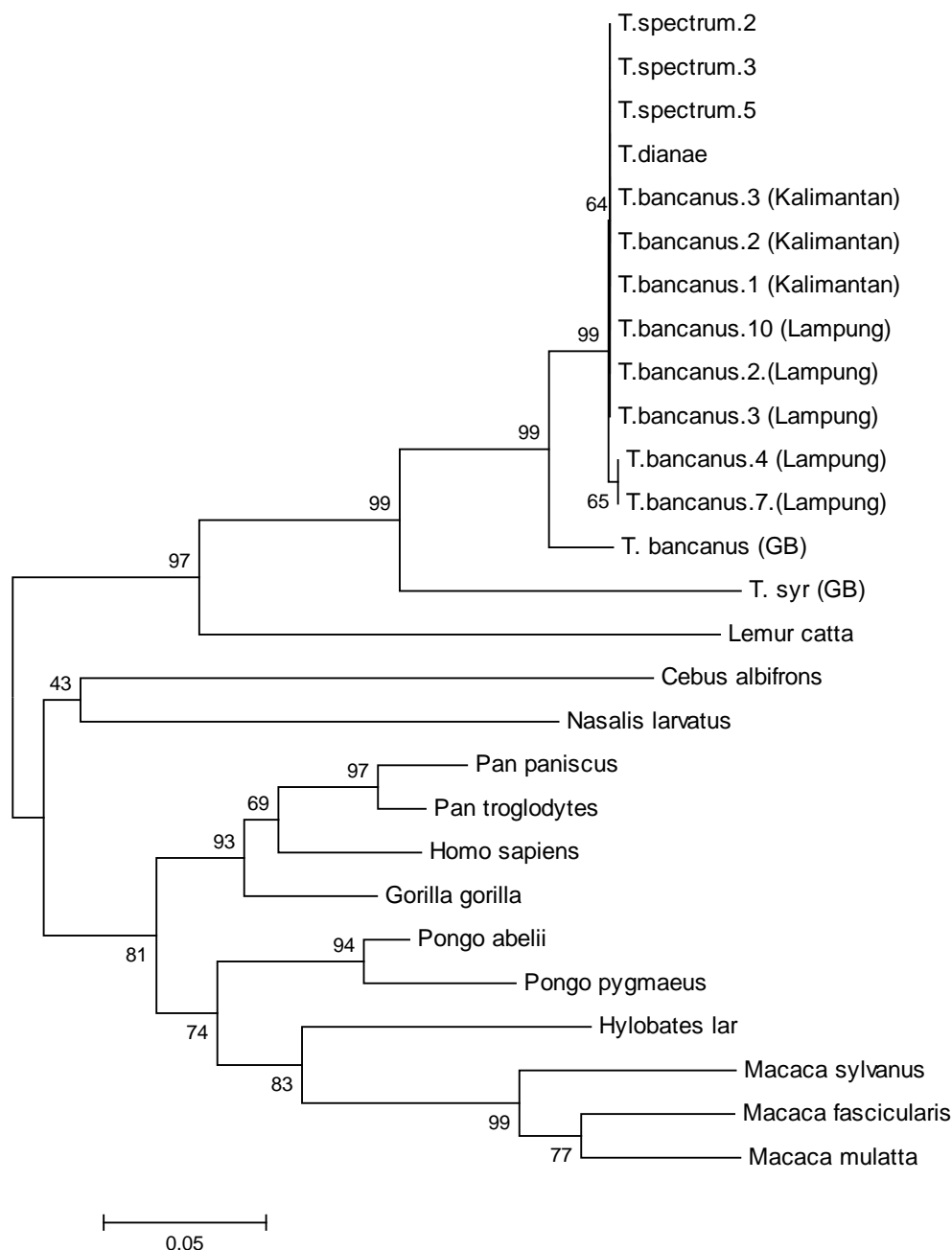
Tabel 2. Jarak genetik *Tarsius* penelitian, *T.bancanus* (*Genbank*) dan *T.syrichtha* (*Genbank*) berdasarkan sekuens nukleotida gen ND4L (297 nt) dengan metode Kimura 2 parameter

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1 T.bancanus (GB)														
2 T.bancanus 4 (L)	0,042													
3 T.bancanus 7(L)	0,042	0,000												
4 T.bancanus 3(L)	0,038	0,003	0,003											
5 T.bancanus 2(L)	0,038	0,003	0,003	0,000										
6 T.bancanus 10(L)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000									
7 T.bancanus 1(K)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000								
8 T.bancanus 2(K)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000							
9 T.bancanus 3(K)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
10 T.dianae (ST)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
11 T.spectrum5 (SU)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000				
12 T.spectrum2 (SU)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000			
13 T.spectrum3 (SU)	0,038	0,003	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		
14 T.syrichtha (GB)	0,178	0,173	0,173	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	0,169	

GB: Genbank; L: Lampung (Sumatera); K: Kalimantan; SU: Sulawesi Utara; ST: Sulawesi Tengah

Pohon filogenetik (filogram) pada penelitian ini berdasarkan sekuen nukleotida gen ND4L sebesar 297 nt, menggunakan metode *Neighbor Joining* dan sebagai pembanding digunakan spesies primata lain yang diambil dari *Genbank*. Filogram disajikan pada Gambar 4. Sesuai dengan kecilnya keragaman nukleotidanya (0,1%), filogram yang dihasilkan memperlihatkan antara *T. spectrum*, *T. diana* (asal Sulawesi), dan *T. bancanus* (asal Lampung, dan Kalimantan) berada dalam subcabang yang sama dan didukung dengan nilai *bootstrap* 99%, sedangkan dengan *T. bancanus* (*Genbank*) berada dalam sub cabang yang berbeda walaupun masih pada cabang yang sama, juga

didukung oleh nilai *bootstrap* 99%. *Tarsius syrichta* (*Genbank*) berada pada cabang yang berbeda oleh karena memiliki jarak genetik yang paling besar terhadap *Tarsius* penelitian ($\pm 17\%$) dan *T. bancanus* (*Genbank*) (17,8%), dengan nilai *bootstrap* 99%. Pola filogram tersebut menunjukkan bahwa hasil yang didapat berbeda dengan pembagian spesies *Tarsius* berdasar morfologi dan vokalisasi (Musser dan Dagosto, 1987 dan Niemitz *et al.*, 1991). Hal ini disebabkan oleh adanya homologi nukleotida yang sangat tinggi antara *Tarsius* asal Sulawesi, yaitu *T. spectrum*, *T. diana*, dan *T. bancanus* asal Lampung dan Kalimantan.



Gambar 4. Filogram berdasarkan sekuen nukleotida gen ND4L sebesar (297 nt), menggunakan metode *Neighbor Joining* (bootstrap 1000 x) pada *Tarsius* sp. dan spesies primata lain yang diambil dari *Genbank*

Pohon filogenetik *Tarsius* sp. berdasarkan sekuens gen ND4L setelah dibandingkan dengan beberapa spesies primata yang lain, terlihat *Tarsius* berada pada kelompok subordo Strepsirrhini, walaupun sampai saat ini berdasar morfologi *Tarsius* masih menjadi perdebatan termasuk subordo Strepsirrhini (kelompok primata kecil) atau intermedier (dipertengahan) antara subordo Haplorrhini (kelompok primata besar) dan Strepsirrhini. Hal ini karena *Tarsius* menunjukkan ciri-ciri di antara keduanya, yaitu nokturnal, mata besar, telinga dapat digerakkan, mempunyai “toilet claw” pada jari kaki kedua dan ketiga, serta mandibula tersusun dari dua tulang seperti yang dimiliki Strepsirrhini dan tidak adanya rhinarium telanjang dan “dental comb”, cermin hidung kering, gigi seri bawah menghadap ke atas, dan plasenta hemochorial yang merupakan ciri dari Haplorrhini (Napier dan Napier, 1983). Filogram tersebut juga sama dengan filogram berdasar sekuens nukleotida gen *Cyt b* (Widayanti *et al.*, 2006), ND3 (Widayanti *et al.*, 2011), *D-loop* (Widayanti dan Solihin., 2007), *COX2* (Widayanti *et al.*, 2010), *ATP 6* (Widayanti dan Handayani, 2011 *in press*) dan *ATP 8* (Widayanti, 2010), yaitu mengelompokkan *Tarsius* sp. pada subordo Strepsirrhini.

KESIMPULAN

Sekuens nukleotida gen *ND4L* pada *Tarsius bancanus* asal Kalimantan, *T. bancanus* asal Sumatra, *T. spectrum* asal Sulawesi Utara, dan *T. diana* asal Sulawesi Utara hanya berbeda pada satu situs saja, yaitu pada situs ke-169 dan semua asam aminonya homolog. Sekuens nukleotida dan asam amino ND4L tidak dapat digunakan untuk membedakan masing-masing *Tarsius* yang diteliti, dan sekuens nukleotida ND4L menempatkan *Tarsius* sp. pada subordo Strepsirrhini.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada DIKTI melalui proyek penelitian Hibah Kompetensi Tahun Anggaran 2010 yang telah memberi dukungan dana untuk penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

- Groves, C. 2001. **Primate Taxonomy**. Smithsonian Inst. Press. London.
- Hofman, S., M. Pabijan, D. Dziewulska-Szwajkowska, and J.M. Szymura. 2012. Mitochondrial genome organization and divergence in hybridizing central European waterfrogs of the *Pelophylax esculentus* complex (Anura, Ranidae). **Gene** 491(1):71-8.
- Merker, S. and C. Groves. 2006. *Tarsius larius*: A new primate species from Western Central Sulawesi. **Int. J. Primatol.** 27:465-485.
- Merker, S., C. Driller, H. Dahrudin, Wirdateti, W. Sinaga, D. Perwitasari-Farajallah, and M. Shekelle. 2010. *Tarsius wallacei*: A new Tarsier species from Central Sulawesi occupies a discontinuous range. **Int. J. Primatol.** (Abstract).
- Musser, G.G., and M. Dagosto. 1987. The identity of *Tarsius pumilus*, a pygmy species endemic to the montane mossy of Central Sulawesi. **Am. Museum. Novitates** 2867:1-53.
- Nei, M. and S. Kumar. 2002. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 5.0**. Inst. of Molecular Evolutionary Genetics. Pennsylvania State University. Pennsylvania
- Napier, J.R. and P.H. Napier. 1983. **The Natural History of The Primates**. British Museum (Natural History). Cromwell Road. London.
- Niemitz, C., A. Nietsch, S. Warter, and Y. Rumpler. 1991. *Tarsius diana*: A new primate species from Central Sulawesi (Indonesia). **J. Folia Primatol.** 56:105-116.
- Pastorini, J., R.D. Martin, P. Ehresmann, E. Zimmermann, and M.R. Forstner. 2001. Molecular phylogeny of the lemur family cheirogaleidae (primates) based on mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.** 19(1):45-56.
- Schmitz, J., M. Ohme, and H. Zischler. 2002. The complete mitochondrial sequence of *Tarsius bancanus*: evidence for an extensive nucleotide compositional plasticity of primate mitochondrial DNA. **J. Mol. Biol. Evol.** 19:544-553.
- Shekelle, M. 2008. The History and Mystery of the Mountain Tarsier, *Tarsius pumilus*. **Primate Conservation** (23):121-124.
- Thompson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, Position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res.** 22:4673-4680.
- Widayanti, R., D.D. Solihin, D. Sajuthi, dan D. Perwitasari. 2006. Kajian penanda genetik gen *Cytochrome B* pada *Tarsius* sp. **J. Sain Vet.** 24(1):1-8.
- Widayanti, R. dan D.D. Solihin. 2007. Kajian penanda genetik *Tarsius bancanus* dan *Tarsius spectrum* dengan sekuens *D-Loop* parsial DNA mitokondria. **Biota** 12(3):170-176.
- Widayanti, R., N.S.H. Handayani, dan I.M. Budiarsa. 2010. Kajian molekular *Tarsius* sp. pada gen penyandi *Cytochrome Oxidase* sub-unit 2 (*COX2*) mitokondria. **Biota** 15(1):98-106.
- Widayanti, R. 2010. Kajian molekuler gen *ATP synthase FO* subunit 8 (*ATP8*) pada DNA mitokondria *Tarsius* sp. **Media Kedokteran Hewan** 26(3):174-182.
- Widayanti, R., N.S.H. Handayani, dan I.M. Budiarsa. 2011. Keragaman genetik gen penyandi *Dehydrogenase* Sub-unit 3 mitokondria pada monyet hantu (*Tarsius* sp.): Upaya konservasi *Tarsius* sp. **Jurnal Veteriner** 12(1):26-33.
- Widayanti, R. dan N.S.H. Handayani. 2011. Kajian keragaman genetik gen *ATP6* *Tarsius* endemis Indonesia: sebagai upaya keberhasilan pelestarian *Tarsius* sp. **Jurnal Veteriner** (*in press*).
- Zardoya, R. and A. Meyer. 1996. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. **Mol. Biol. Evol.** 13(7):933-942.
- Zhang, S., Y. Zhang, X. Zheng, Y. Chen, H. Deng, D. Wang, Q. Wei, Y. Zhang, L. Nie, and Q. Wu. 2000. Molecular phylogenetic systematics of twelve species of Acipenseriformes based on mtDNA ND4L-ND4 gene sequence analysis. **Sci. China Life Sci.** 43(2):129-137.